

论 著

肺癌靶向血栓蛋白 hu3D3V_HtTF 的表达及活性鉴定

颜江华, 王生育, 王阶平, 王勇军, 黄志平, 王 臻

(厦门大学 医学院 抗癌研究中心, 福建 厦门 361005)

摘 要:目的 制备一种用于肺癌血管靶向栓塞治疗的融合蛋白 hu3D3V_HtTF,并鉴定其生物学活性。方法 利用重叠 PCR 技术构建 tTF 与 hu3D3V_H 的融合基因,克隆至表达载体 pET22 b(+),在 *E. coli* BL21(DE₃) 中表达,镍亲和和色谱柱纯化目的蛋白。ELISA 检测融合蛋白 hu3D3V_H 组分与肺腺癌细胞 A549 选择性结合活性,凝血实验和 F 活化实验鉴定融合蛋白 tTF 组分的促凝血活性。结果 获得序列正确的 hu3D3V_H/tTF/pET22 b(+) 重组子,融合蛋白在 *E. coli* BL21(DE₃) 中高效表达。纯化后的融合蛋白与肺腺癌细胞 A549 具有选择性结合活性,并能活化 F、有效促发血液凝固。结论 成功构建 hu3D3V_H/tTF/pET22 b(+) 重组子,hu3D3V_H/tTF 融合蛋白具有 hu3D3V_H 的选择性结合能力同时具有 tTF 的促凝血活性,为开展选择性肺肿瘤血管血栓性栓塞研究奠定了基础。

关键词: hu3D3V_H; tTF; 血栓; 肺癌**中图分类号:** Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-1678(2008)01-0001-04

Expression and activity characterization of thrombosis targeting protein hu3D3 V_HtTF to blood vessel of lung cancer

YAN Jiang-hua, WANG Sheng-yu, WANG Jie-ping, WANG Yong-jun, HUANG Zhi-ping, WANG Zhen
(Cancer Research Center of Medical School, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: **Purpose** To prepare the fusion protein of hu3D3V_HtTF for thrombosis targeting therapy of lung cancer and to analyze its biological activities. **Methods** Fusion gene hu3D3V_HtTF was constructed by overlap PCR, cloned into expression vector pET22 b(+), and expressed in *E. coli* BL21(DE₃). The fusion protein hu3D3V_HtTF was purified through Nickel-affinity chromatography column. The selective binding activity of the hu3D3V_H moiety of fusion protein was analyzed using ELISA and the coagulation activity of the tTF moiety of fusion protein was detected by clotting assay and F activation assay. **Results** The recombinant plasmid hu3D3V_HtTF /pET22 b(+) with correct sequence was obtained and expressed highly in *E. coli* BL21(DE₃). The purified fusion protein hu3D3V_HtTF demonstrated both the selective binding activity to human lung adenocarcinoma A549 and activities of activating F and inducing blood plasma clotting. **Conclusion** The recombinant hu3D3V_HtTF/pET22 b(+) was successfully established. Expressed protein hu3D3V_HtTF showed both selective binding activity of hu3D3V_H and activities of tTF initiating coagulation, which provided a basis for further study on the thrombosis targeting therapy in animal model of lung cancer.

Key words: hu3D3V_H; tTF; thrombosis; lung cancer1997 年 Huang 等^[1]首先提出了 1 种新颖的肿瘤

血管靶向策略,即将抗肿瘤血管标志物的抗体和具有潜在凝血功能的 tTF 相结合,制备抗体与 tTF 的融合蛋白。动物实验证实该融合蛋白可以选择性地诱发肿瘤血管栓塞,进而导致肿瘤消退。尽管早期研究认为靶向载体的靶点最好是位于新生的肿瘤血管,但后来的研究证实,靶向肿瘤细胞膜的载体也能有效诱发选择性肿瘤血管血栓^[2]。组织因子 (TF,

收稿日期: 2007-08-28

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (C0410004) 和厦门大学科技创新项目 (XD4CX20053026)

作者简介: 颜江华 (1963-),男,福建德化人,副教授,博士,主要从事免疫学与生物制药研究, Tel: 0592-2180587, E-mail: jhyan@xmu.edu.cn.

tissue factor) 是外源性凝血通路的促发因子。截短组织因子 (tTF, truncated tissue factor) 是 TF 的胞外区, 不能激发细胞 TF 信号通路, 但保留了与 F 或 F_a 结合并激活 F 和 F_a 的活性。游离的 tTF 对 F 的激活能力要比完整的跨膜 TF 低 5 个数量级^[3-4], 故血循环中单独游离的 tTF 并不能有效促发血液凝固; 但当 tTF 借助靶向载体, 富集于细胞膜后则可有效促发外源性通路。富集于细胞膜的 tTF 恢复了 TF 的活性可在靶点诱发血管发生血液凝固、血栓形成, 导致肿瘤组织细胞的缺血缺氧、变性坏死, 产生抗肿瘤作用。hu3D3V_H 是人源化的抗人肺癌单域抗体, 能选择性与肺腺癌细胞膜结合^[5]。本文利用基因工程技术构建 hu3D3V_HtTF 融合蛋白, 在体外探讨利用 hu3D3V_H 介导 tTF 选择性诱发肺癌组织血管血栓性栓塞的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和细胞株 大肠杆菌 BL21 (DE3) 由本室保藏; 质粒 pET22 b (+) 购自 Novagen 公司; hu3D3V_H/pET22 b (+) 质粒本室构建; tTF/pSK (+) 质粒由美国南加州大学 Epstein 教授惠赠; 人肺腺癌细胞株 A549 和人胃癌细胞株 MGC-803 由本室保存。

1.1.2 工具酶及试剂 工具酶购自 NEB 公司; DNA 纯化试剂盒为 OMEGA 公司产品; DNA 序列分析由上海博亚公司完成; 鼠抗 6 × His mAb 和 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自上海生工公司; S2222 为上海申海生化科技公司生产; F 和 F_a 购自 Sigma 公司。

1.1.3 引物 设计从质粒 hu3D3V_H/pET22 b (+) 和 tTF/pSK (+) 中扩增 hu3D3V_H 和 tTF 基因的引物由上海生工生物工程技术有限公司合成; 扩增 hu3D3V_H 基因 (354 bp) 的引物: p3D3 (5') : 5' ATGGC-CATGGCGCTGAACTGCAAG 3'、p3D3 (3') : 5' GCT-GCTGACGCTCACGGTGG 3', 扩增 tTF (657bp) 的引物: ptTF (5') : 5' TCTGGCACTACAAATACTGT 3'、ptTF (3') : 5' GGTG-CTCGAGTTCTCTGAATTC 3'。hu3D3V_H 和 tTF 基因之间由 Linker (G4S) 连接, pLinker : 5' CCAC-CGTGACGTCACGCGGAGCGCGGTGGTCTCTCTTGGC-ACTACAAA TACTGT 3' (加粗部分为 y 与 3D3 基因 3 端互补的序列, 加下划线序列为 G4S, 斜体部分为与 tTF 基因 5 端互补的序列)。融合基因两端由 p3D3 (5') 和 ptTF (3') 引物分别引入 *Nco* 和 *Xho* 内切酶位点 (下划线标示)。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增基因 用引物 p3D3 (5')、p3D3

(3') 扩增 hu3D3V_H 基因, 用 ptTF (5')、ptTF (3') 扩增 tTF 基因, 反应条件均为: 95 变性 5 min 后, 95 变性 45 s, 53 退火 1 min, 72 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 延伸 10 min。以 tTF 扩增产物为模板, 用引物 pLinker、ptTF (3') PCR 引入 Linker 序列, 最后用引物 p3D3 (5')、ptTF (3') 将 hu3D3V_H 和 tTF 拼接成融合基因 hu3D3V_HtTF, 反应条件为: 95 预变性 4 min; 95 变性 40 s, 53 退火 45 s, 72 延伸 1 min, 循环 10 次; 95 变性 4 min; 95 变性 40 s, 58 退火 45 s, 72 延伸 1 min, 循环 30 次; 72 延伸 10 min。扩增产物在 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.2 重组表达质粒的构建 将得到的 hu3D3V_HtTF 基因与载体 pET-22b 用 *Nco* 和 *Xho* 双酶切, 用胶纯化试剂盒回收。用 T4 DNA 连接酶将 hu3D3V_HtTF 基因克隆至载体 pET-22b 中, 构建重组质粒 hu3D3V_HtTF/pET-22b (+), 转化 *E. coli* BL21 (DE3), 重组子质粒经 PCR 筛选和酶切鉴定, 阳性克隆送上海英俊生物技术有限公司测序, 将测序正确的重组质粒命名为 hu3D3V_HtTF/pET-22b (+)。

1.2.3 融合蛋白的表达及纯化 挑含正确重组质粒 hu3D3V_HtTF/pET-22b (+) 的单菌落 37 培养过夜, 按 1 : 100 稀释至 2 YT 中扩大培养后, 通过不同的诱导时间和异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl-β-D-1-Thiogalactopyranoside, IPTG) 浓度优化其表达条件。在扩大培养至 A_{600nm} 为 0.4 ~ 0.6 时加 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L 诱导表达 6 h。由于 pET22 b (+) 表达的 tTF/SA 融合蛋白 C 端带有 6 × His 标签, 故目的蛋白纯化方案参照 Amersham Pharmacia Biotech 公司的镍柱蛋白纯化操作手册。纯化后的蛋白进行 12 % SDS-PAGE 分析鉴定, 并采用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 透析复性。

1.2.4 选择性结合反应 ELISA 检测 96 孔板每孔接种 5 × 10⁵ 个 A549 细胞或 MGC-803 细胞, 置 CO₂ 培养箱过夜培养, 弃培养基, 每孔加甲醇固定 10 min, PBS 洗涤后备用。用 ELISA 分析 hu3D3V_HtTF 与靶细胞的结合活性, 包被 A549 细胞或 MGC-803 细胞的培养板分别加入等摩尔的 hu3D3V_HtTF 或 hu3D3V_H 于 37 温育 1 h, 加入鼠抗 6His-HRP 37 温育 1 h, 加 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-Tetramethyl benzidine, TMB) 100 μL 显色 10 min, 1 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 测定 A_{405nm} 值。每步骤间用 PBS 洗 5 次, 每次 3 min。

1.2.5 融合蛋白 tTF 部分的活性鉴定

1.2.5.1 凝血实验 参照 Haubitz 等^[6]的方法并稍

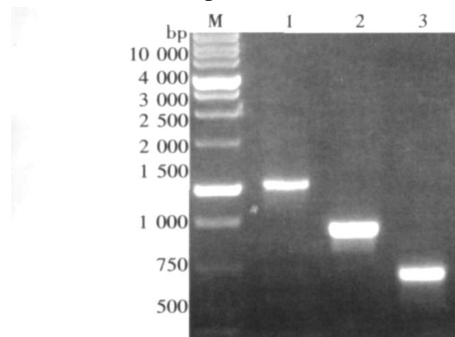
作修改,用 3.8% 的柠檬酸钠处理新鲜小鼠血液,4 000 r/min 离心,留血浆。凝血板每孔加血浆 30 μ L,分别加系列浓度的 hu3D3V_HtTF 和终浓度为 12.5 mmol/L 的 CaCl₂,设只加 hu3D3V_HtTF 和只加 CaCl₂ 溶液的对照,室温下记录从加入 CaCl₂ 溶液至血浆开始出现不流动的时间。

1.2.5.2 F 活化实验 Hische 等^[7]发现,TF-F a 复合物活化 F 可以使 S2222(多肽对硝基苯胺复合物)分解为多肽和对硝基苯胺,后者在 405 nm 有吸收峰,测吸光度可间接反映 TF 水平。所以用 F 活化实验进一步鉴定融合蛋白 tTF 部分的活性及其水平。在 Tris 缓冲液中加系列浓度的 hu3D3V_HtTF 或牛血清白蛋白(BSA),加 100 nmol/L F₃₇ 温育 10 min,加 F 至终浓度 5 nmol/L,室温温育 10 min,加入 0.1 mol/L EDTA 终止反应,加 2 nmol/L 生色底物 S2222,在 3 min 之内用酶标仪测 A_{405nm}。

2 结果

2.1 PCR 扩增 tTF/SA

PCR 扩增的产物,经琼脂糖凝胶电泳检测,得到与预期大小相符的特异性条带,hu3D3V_H和 tTF 加上酶切位点和保护性碱基分别为 363 bp、667 bp,3D3-tTF 融合基因加上酶切位点、保护性碱基和 Linker 为 1 045 bp(见图 1)。



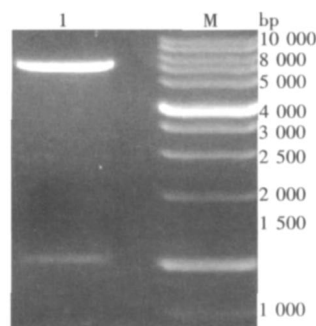
M. 1 000 bp 标准 DNA; 1. hu3D3V_HtTF(1 045 bp); 2. tTF(667 bp); 3. hu3D3V_H(363 bp)
M. 1 000 bp DNA Ladder; 1. hu3D3V_HtTF(1 045 bp); 2. tTF(667 bp); 3. hu3D3V_H(363 bp)

图 1 PCR 产物电泳图(1.0%琼脂糖)

Fig 1 1.0% Agarose gel electrophoresis of PCR products

2.2 重组质粒的构建与鉴定

hu3D3V_HtTF 基因与载体连接后,转化感受态细菌,筛选氨苄青霉素抗性阳性和 PCR 初筛阳性的克隆,挑取单菌落扩大培养,提取质粒酶切,分别得到约为 5 400 bp、1 031 bp 的片段,与预期结果相符,结果见图 2。测序结果证明 hu3D3V_HtTF 基因插入的位置、大小和读码框均正确(测序结果略)。



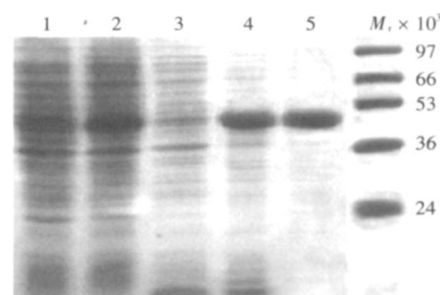
M. 1 000 bp 标准 DNA; 1. *Nco* / *Xho* 双酶切后的重组质粒片段
M. 1 000 bp DNA Ladder; 1. Plasmid fragment digested with *Nco* / *Xho*

图 2 重组质粒 pET22-b/3D3-tTF 的酶切鉴定

Fig 2 Identification of the recombination plasmid pET22-b/3D3-tTF by digestion with different restriction enzymes

2.3 融合基因 hu3D3V_HtTF 在 *E. coli* BL21(DE3) 中的表达

将表达产物裂解上清液、表达产物超声上清、沉淀分别电泳,经过染色、脱色,约在相对分子质量(M_r)40 000 处有一明显的表达带,表明 hu3D3V_HtTF 基因获得表达,而未诱导菌没有出现相同的条带,同时观察到目的蛋白绝大部分存在于超声沉淀中,说明融合蛋白在宿主菌中主要以包涵体的形式存在。包涵体处理后,过 Ni²⁺ 亲和柱,用洗脱液(0.02 mol/L Tris-HCl, pH 7.9, 1 mol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl)回收亲和蛋白,电泳后几乎只出现 1 条蛋白质条带,说明经亲和和色谱纯化到较高纯度的 hu3D3V_HtTF 融合蛋白(图 3)。通过紫外分光光度计扫描,按照蛋白质浓度(C): $C = 1.45A_{280nm} - 0.74A_{260nm}$,测得 hu3D3V_HtTF 融合蛋白的浓度为 1.6 mg/mL。



1. 细胞抽提物(IPTG-); 2. 细胞抽提物(IPTG+); 3. 超声波破碎上清; 4. 超声波破碎后沉淀部分; 5. 洗脱蛋白; M. 标准蛋白

1. Cell extract induced without IPTG; 2. Cell extract induced with IPTG; 3. Supernatant after fragmenting by ultrasonic; 4. Precipitate after fragmenting by ultrasonic; 5. Protein washed by elute buffer; M. Protein marker

图 3 表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig 3 SDS-PAGE analysis of the expression of fusion protein

2.4 hu3D3V_HtTF 活性鉴定

2.4.1 靶细胞选择性结合实验 hu3D3V_HtTF 和

3D3V_HC 端均带有 6 ×His tag,利用鼠抗 6 ×His mAb 检测它们与不同细胞的结合反应。ELISA 表明,纯化后的 hu3D3V_HtTF 可与人肺腺癌细胞 A549 结合,而不与人胃癌细胞 MGC-803 反应(结果未显示)。等摩尔的 hu3D3V_HtTF 与人肺腺癌细胞 A549 结合能力与 3D3V_H 反应相似(图 4),它们最小有效度均为约 0.3 pmol/L。

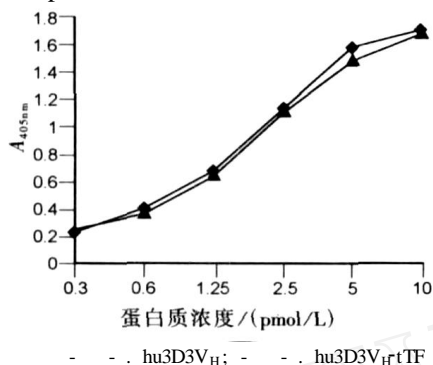


图 4 hu3D3V_HtTF 与肺腺癌 A549 细胞株的反应性

Fig 4 Reactivities of hu3D3V_HtTF to Lung cancer cell line A549

2.4.2 凝血实验 测定在室温下 hu3D3V_HtTF 促发抗凝血液的凝固作用,结果见表 1。经柠檬酸钠处理过的血浆在仅加 12.5 mmol/L Ca²⁺ 或 4 μmol/L hu3D3V_HtTF 时 30 min 内不发生凝固;但 hu3D3V_HtTF 和 Ca²⁺ 同时存在时,血浆发生凝固,并随 hu3D3V_HtTF 浓度的增加凝血时间缩短。等摩尔的 hu3D3V_HtTF 促发血浆凝固作用与 tTF 相似,最小有效度均约为 1.0 μmol/L。

表 1 hu3D3V_HtTF 融合蛋白的凝血作用

Tab 1 Clotting of hu3D3V_HtTF fusion proteins

tTF 融合蛋白 / (μmol/L)	CaCl ₂ / (mmol/L)	时间/ min	
		hu3D3V _H tTF	tTF
0	0	> 30	> 30
0	12.5	> 30 ^a	> 30 ^b
0.5	12.5	> 30	> 30
1.0	12.5	14.3 ± 1.5 ¹	14.1 ± 1.5 ¹
2.0	12.5	10.6 ± 1.8 ¹	10.1 ± 2.0 ¹
4.0	12.5	8.5 ± 2.3 ¹	8.3 ± 2.1 ¹
4.0	0	> 30	> 30

与对照组 a 或 b 比较:¹ P < 0.01

Compared with the control group a or b:¹ P < 0.01

2.4.3 F 活化实验 分别检测 0.01, 0.1, 1 和 10 μmol/L hu3D3V_HtTF 和 hu3D3V_H 在 F 活化反应后的 A_{405nm}(见图 5)。结果融合蛋白在 1 μmol/L 以上时能有效活化 F, 增强 405 nm 处吸收峰,而同摩尔浓度的 hu3D3V_H 未见反应。

3 讨论

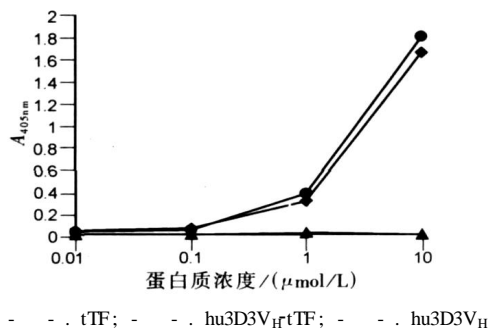


图 5 hu3D3V_HtTF 对 F 的活化实验

Fig 5 F activation by hu3D3V_HtTF

血管存在及其血液供应是实体瘤赖以生存的基本条件,选择性阻断肿瘤血管或阻断血流供应,可有效抑制肿瘤组织生长或导致大量肿瘤细胞死亡甚至使肿瘤完全消退。本文利用基因工程技术,成功构建了 hu3D3V_HtTF/pET22b(+) 表达载体,并在原核系统高效表达。ELISA 结果显示 hu3D3V_HtTF 融合蛋白可以选择性结合肺癌靶细胞 A549,其结合力与 hu3D3V_H 相似,其最小结合反应浓度约为 0.3 pmol/L。F 活化实验和凝血实验结果证明 hu3D3V_HtTF 可以促使 F 活化并有效诱发抗凝血液凝固,其最小有效度约为 1.0 μmol/L。hu3D3V_HtTF 融合蛋白最小结合反应浓度远低于其最小效应浓度(低于 300 倍),提示 hu3D3V_HtTF 可以发挥较好的选择性凝血作用。本工作为进一步开展选择性肺癌血管栓性栓塞治疗研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Huang XM, Molema G, King S, et al. Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature [J]. Science, 1997; 275 (5299): 547-550.
- [2] Liu C, Huang H, Donate F, et al. Prostate-specific membrane antigen directed selective thrombotic infarction of tumors [J]. Cancer Res, 2002, 62 (19): 5470-5475.
- [3] Davie E W, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation [J]. Biochemistry, 1991, 30 (43): 10363-10370.
- [4] Ruf W, Rehemtulla A, Morrissey J H, et al. Phospholipid-independent and -dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor function [J]. J Biol Chem, 1991, 266 (4): 2158-2166.
- [5] 王阶平, 庄国洪, 杨桂旺, 等. 人源化抗人肺癌单域抗体的基因构建、表达及活性分析 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2006, (2): 151-153.
- [6] Haubitz M, Brunkhorst R. Influence of a novel rapamycin analogon SDZ RAD on endothelial tissue factor and adhesion molecule expression [J]. Transplant Proc, 2002, 34 (4): 1124-1126.
- [7] Hische E A, Tutuarima J A, Helm H J. Spectrophotometry of tissue thromboplastin in cerebrospinal fluid [J]. Clin Chem, 1981, 27 (8): 1427-1430.